

## 明 細 書

動物の虹彩色素上皮細胞由来の多能性幹細胞から組織細胞を生産する方法、およびその方法により得られる組織細胞

### 技術分野

[0001] 本発明は、動物の虹彩色素上皮細胞から多能性幹細胞を生産し、その多能性幹細胞から組織細胞を生産する方法、およびその方法により得られる組織細胞に関するものである。

### 背景技術

[0002] 近年、脳、脊髄由来の神経幹細胞や、ES細胞(胚性幹細胞)の多分化機能を利用して細胞をつくり、これを移植するという再生医療が注目されている。

[0003] 上記神経幹細胞やES細胞の医療への応用を考えた場合には、細胞移植による免疫拒絶の問題、倫理的問題、移植細胞源の需要と供給のアンバランスなどの多くの問題が生じる。

[0004] そこで、移植対象となる個体自身に由来する細胞を移植源として用いることが可能となれば、自家移植が可能となり上記の問題を解決することができる。

[0005] 上記移植源としての利用が期待されている細胞として、眼球の虹彩色素上皮細胞がある。

[0006] 虹彩色素上皮細胞は、光量に応じて瞳孔を開いたり、狭めたりして網膜に届く光量を調節するための組織である虹彩を構築している細胞のひとつである。

[0007] 本発明者は、これまでにニワトリの雛の虹彩色素上皮細胞を単離培養することに成功したことを、非特許文献1: Experimental Cell Res. (1998) 245, 245-251: で報告している。

[0008] さらに、本発明者は、上記非特許文献1の方法に改変を加えることにより、哺乳動物(マウス、ラット、ヒト胎児)の虹彩細胞の単離培養を可能とした(非特許文献2: nature

neuroscience (2001) 4 (12), 1163:を参照)。

[0009] 虹彩色素上皮細胞は、患者本人からその細胞の一部を採取することが可能である

ので、もし、虹彩色素上皮細胞を用いた組織細胞の生産が可能となれば、患者自身の細胞を用いた再生医療が実現することになる。(なお、本発明者が調査した限りでは、本発明にかかる、動物の虹彩色素上皮細胞由来の幹細胞から組織細胞を生産する方法、およびこの方法により得られる組織細胞に関する従来技術文献は見出されなかった。)

しかしながら、動物の虹彩色素上皮細胞から神経系以外の組織細胞を生産する方法は確立されていない。

- [0010] 本発明は、上記従来の問題点に鑑みてなされたものであって、その目的は、細胞移植による免疫拒絶の問題、倫理的問題、移植細胞源の需要と供給のアンバランスなどの問題を解決し得る、動物の虹彩色素上皮細胞由来の組織細胞の生産方法、およびその方法により得られる組織細胞を提供することにある。

#### 発明の開示

- [0011] 本発明者は、上記課題について鋭意検討した結果、動物の眼球から単離した虹彩色素上皮細胞を浮遊凝集塊培養方法により選択的に培養して得た幹細胞を特定の培養条件で維持すると凝集塊が得られること、また該凝集塊は胚様体(embryoid body)構造を形成しており、その中には、例えば筋肉細胞や血管内皮様細胞などの様々な組織細胞が含まれることを見出し、本発明を完成させるに至った。つまり、本願発明者は、動物の眼球から単離した虹彩色素上皮細胞を浮遊凝集塊培養方法により選択的に培養して得た幹細胞は、種々の組織に分化する能力を有する多能性幹細胞であることを見出した。

- [0012] 本発明の組織細胞の生産方法は、上記課題を解決するために、動物の眼球から単離した虹彩色素上皮細胞を浮遊凝集塊培養方法により選択的に培養することで多能性幹細胞を得る工程と、上記多能性幹細胞を培養して、当該多能性幹細胞から組織細胞を得る工程とを含むことを特徴としている。

- [0013] 上記の構成によれば、従来公知の動物成体の虹彩色素上皮の単離方法により、動物の眼球から虹彩組織を摘出し、虹彩組織から虹彩色素上皮を単離し、単離した虹彩色素上皮を、浮遊凝集塊培養方法により選択的に培養することにより多能性幹細胞を得ることができる。

- [0014] そして、上記多能性幹細胞を培養することにより、胚様体(embrioid body)構造を形成することができる。
- [0015] 上記胚様体は、主にES細胞から分化誘導されて生じる胚のような組織を含む構造体である。この胚様体は、三胚葉性細胞を含んでいることから、虹彩由来幹細胞がES細胞に似た全能性を保持すると考えられる。そこで、この虹彩上皮細胞由来の胚様体構造に含まれる細胞を、本発明では動物の虹彩色素上皮細胞由来の組織細胞と称する。
- [0016] なお、本発明の組織細胞の生産途中で得られる多能性幹細胞は、自家組織から比較的簡便かつ低侵襲性に採取、作製できるという優位性を有している。即ち、既存のES細胞のように、胎児胚由来であるということに起因する倫理性や免疫拒絶の問題を有さず、また、多能性成体幹細胞(multipotent adult progenitor/stem cells:MAPC)の様に骨髓穿刺といった侵襲性の高い回収法を用いる必要もない。
- [0017] 本発明では、上記動物は、例えば、ニワトリ、マウス、ラット、またはヒトのいずれかである。また、上記動物は、胎児期の個体を使用することが可能であるが、出生後の個体も使用可能である。上記出生後の個体とは、出生前の胎児を除く個体のことを意味する。この出生後の個体としては、性成熟後の成体、出生直後の幼体などが挙げられるが、どの時期の個体でもよい。
- [0018] また、上記多能性幹細胞は、以下の(1)、(2)の性質のうちの少なくとも何れかを有している。
- (1) Oct-3/4陽性である。
  - (2) 三胚葉性分化能を有する。
- 上記(1)、(2)については、実施例において説明する。
- [0019] また、本発明の組織細胞の生産方法において、上記多能性幹細胞から組織細胞を得る工程では、上記多能性幹細胞を、分化条件下の培養において、1種類以上の組織細胞に分化させる。
- [0020] ここで、上記分化条件下の培養とは、細胞を分化させることを目的とした従来公知のあらゆる条件下の培養を含む。具体的には、血清や各種成長因子(FGF、EGF、CNTF、RAなど)を加えた培地で、様々な細胞外基質成分をコートした培養皿中での

培養方法のことを言う。このように、上記多能性幹細胞は、分化条件下の培養によって、1種類もしくは数種類の組織細胞に分化する分化能を有している。

[0021] 上記分化条件下の培養では、血清を用いて培養を行うことが好ましい。上記血清は、例えば、ウシ胎児血清またはトリ血清である。

[0022] また、上記分化条件下の培養において、さらに成長因子を用いてもよい。上記成長因子としては、例えば、EGF (epidermal growth factor: 上皮成長因子)、FGF (fibroblast growth factor: 繊維芽細胞成長因子) 等を用いることができる。

[0023] 本発明にかかる上記組織細胞は、患者本人からその細胞の一部を採取することが可能な虹彩色素上皮細胞に由来している。したがって、本発明によれば、動物の虹彩色素上皮細胞から、再生医療で移植源として活用できる組織細胞を生産することができる。

[0024] また、本発明の組織細胞の生産方法では、上記虹彩色素上皮細胞は、動物の眼球から虹彩組織を摘出する虹彩組織摘出工程と、摘出した上記虹彩組織から虹彩色素上皮を分離する虹彩色素上皮分離工程とにより単離されることを特徴としている。

[0025] これによれば、動物の虹彩色素上皮細胞を効率よく分離することで、本発明の組織細胞を効率よく生産することができる。

[0026] また、本発明では、上記虹彩組織摘出工程は、動物の眼球から虹彩組織のみを切除する虹彩組織切除段階と、上記切除した虹彩組織を酵素処理する酵素処理段階と、上記酵素処理した虹彩組織を回復させる虹彩組織回復段階とを含んでいることを特徴としている。

[0027] これによれば、動物の眼球から虹彩組織のみを効率よく摘出することで、本発明の組織細胞をより効率よく生産することができる。

[0028] 本発明にかかる組織細胞は、本発明の組織細胞の生産方法を用いて得られるものであり、上述したように、動物の虹彩色素上皮細胞に由来したものである。したがって、本発明の組織細胞を、細胞移植による免疫拒絶の問題、倫理的問題、移植源細胞の需要と供給のアンバランスなどの問題を解決し得る移植細胞源として提供することができる。

[0029] そして、本発明にかかる組織細胞は、外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞、中胚葉細胞または中胚葉由来の細胞、内胚葉細胞または内胚葉由来の細胞のうちの何れかである。

[0030] さらに、本発明の組織細胞は、生体内の器官を構成する組織を形成するものである。この「生体内の器官を構成する組織」とは、具体的には、神経系器官、筋肉系器官、心臓、血管などといった各器官を構成している神経組織、筋組織、心臓組織、血管組織などのことである。

[0031] 本発明のさらに他の目的、特徴、および優れた点は、以下に示す記載によって十分分かるであろう。また、本発明の利点は、次の説明によって明白になるであろう。

#### 図面の簡単な説明

[0032] [図1]本発明にかかる組織細胞の生産方法の一例を示す概略工程図である。

[図2]実施例1にかかる幹細胞の様子を示す図である。

[図3(a)]実施例1において、デスミン(筋肉細胞マーカー)抗体、およびDAPI染色(核)にて標識を行った凝集塊を示す図である。

[図3(b)]実施例1において、デスミン(筋肉細胞マーカー)抗体、およびDAPI染色(核)にて標識を行った凝集塊を示す図である。

[図4]実施例2において、虹彩色素上皮細胞から各組織細胞を誘導する各工程における心筋細胞の出現を示す図である。

[図5]マウス初期発生過程におけるOct-3/4発現様式を説明する図である。

[図6(a)]実施例3において、ラットから得た幹細胞をOct-3/4抗体による染色およびDAPI染色にて標識を行った結果を示す図である。

[図6(b)]実施例3において、ラットから得た幹細胞をOct-3/4抗体による染色およびDAPI染色にて標識を行った結果を示す図である。

#### 発明を実施するための最良の形態

[0033] 本発明の実施の一形態について図1に基づいて説明すれば、以下の通りである。なお、本発明はこれに限定されるものではない。

[0034] 本発明者は、再生医療における細胞移植による免疫拒絶の問題、倫理的問題、移植細胞源の需要と供給のアンバランスなどの問題を解決する目的で、動物の虹彩色

素上皮細胞由来の組織細胞を生産した。

- [0035] 本実施の形態にかかる組織細胞の生産方法は、動物の眼球から単離した虹彩色素上皮細胞を浮遊凝集塊培養方法により選択的に培養することで多能性幹細胞を得る工程と、上記多能性幹細胞を培養して、当該多能性幹細胞から組織細胞を得る工程とを含む構成である。
- [0036] すなわち、本実施形態の組織細胞の生産方法は、図1に示すように、少なくとも、動物の眼球から虹彩色素上皮細胞を単離する虹彩色素上皮細胞単離工程(ステップ1、以下ステップをSと略す)と、単離した虹彩色素上皮細胞を浮遊凝集塊培養方法により選択的に培養することで多能性幹細胞を得る工程(以下、幹細胞生産工程と呼ぶ)(S2)と、上記多能性幹細胞を血清などを用いて培養して、当該多能性幹細胞から組織細胞を得る工程(以下、幹細胞培養工程と呼ぶ)(S3)とを含んでいる。なお、本発明にかかる組織細胞の生産方法はこれに限定されるものではなく、他の工程が含まれていてもよい。また、S3の幹細胞培養工程は、組織細胞誘導工程と呼ぶこともできる。
- [0037] 上記動物は、出生後の個体であれば、幼体から成体に至るまでのどの時期の個体であってもよい。すなわち、本実施の形態にかかる組織細胞の生産方法は、動物幼若個体虹彩色素上皮細胞由来の組織細胞を生産することが可能なことは言うまでもないが、動物成体の虹彩色素上皮細胞由来の組織細胞を生産することが可能である。
- [0038] S1の虹彩色素上皮細胞単離工程は、虹彩色素上皮細胞を単離できればよく、その具体的な手法等については特に限定されるものではない。一般的には、従来公知の手法を利用して、動物の眼球から虹彩組織を摘出し、摘出した虹彩組織から虹彩色素上皮細胞を単離すればよい。動物の眼球から虹彩組織を摘出する方法としては、nature neuroscience (2001) 4 (12), 1163(前記非特許文献2)に記載の方法を用いることが好ましい。
- [0039] S2の幹細胞生産工程は、動物の眼球から単離した虹彩色素上皮細胞のみを選択的に培養できればよく、その具体的な手法等については特に限定されるものではない。一般的には、従来公知の手法を利用して、動物の眼球から単離した虹彩色素上

皮細胞のみを選択的に培養すればよい。

- [0040] ここで、幹細胞生産工程(S2)には、プロセス6(以下、プロセスをPと略す)として、虹彩色素上皮細胞単離工程(S1)において単離された虹彩色素上皮細胞を、凝集している状態から個々の細胞に解離するための細胞解離段階と、P7として、単離した虹彩色素上皮細胞のみを選択的に培養する細胞培養段階とが含まれる。
- [0041] 以下、幹細胞生産工程(S2)の各段階P6およびP7について詳細に説明する。まず、P6の細胞解離段階では、単離された虹彩色素上皮のシート状の細胞を個々の細胞に解離する。
- [0042] 例えば、P6の細胞解離段階は、市販のトリプシン溶液を用いて、単離された虹彩色素上皮のシート状の細胞を個々の細胞に解離する。また、例えば、P6の細胞解離段階は、トリプシン溶液を用いずに、市販のマイクロピペットを用いたピペッティング操作により、単離された虹彩色素上皮のシート状の細胞を個々の細胞に解離することもできる。
- [0043] なお、P6の細胞解離段階に用いられる試薬および器具は、特に限定されるものではなく、単離された虹彩色素上皮細胞を凝集している状態から個々の細胞に解離することが可能な従来公知の試薬および器具を用いることができる。
- [0044] P7の細胞培養段階では、単離した虹彩色素上皮細胞を浮遊状態でFGF(fibroblast growth factor: 繊維芽細胞成長因子)、LIF(leukemia inhibitory factor: 白血病阻害因子)、あるいはSCF(human SCF (Stem Cell Factor: ヒト幹細胞因子)の単独、または組み合わせによる因子添加の無血清培地で培養する。これにより、上記虹彩色素上皮細胞を未分化状態で増やすことが可能となるので、その結果得られる組織細胞も多くなる。この段階では、Science 1992: 225; 1707-1710に記載の浮遊凝集塊培養法(neurosphere法)を用いて、動物の眼球から単離した虹彩色素上皮細胞を選択的に培養することが好ましい。
- [0045] 例えば、P7の細胞培養段階では、市販の無血清培地に市販のN2サプリメントを加えたものを浮遊凝集塊培養用の培養液として使用する。P6の細胞解離段階にて解離された上記虹彩色素上皮細胞を、上記浮遊凝集塊培養用の培養液中にて、市販のシェーカーを用いて回転を加えながら培養する。これによって、多能性幹細胞を多

く含む細胞集団を選択的に分離、回収することができる。

- [0046] なお、P7の細胞培養段階に用いられる培養液および試薬は、特に限定されるものではなく、上記幹細胞を得ることが可能な従来公知の培養液および試薬を用いることができる。
- [0047] また、本実施の形態では、P7の細胞培養段階における培養期間は、必要に応じて適宜設定すればよいものとする。ただし、このとき培養を長く続けすぎると、得られる凝集塊が大きくなりすぎて分化してしまう虞がある。そこで、本実施の形態では、3〜4日以内に細胞を解離して巻き込む(継代)することが望ましい。
- [0048] そして、S3の幹細胞培養工程で、血清を用いてP7の細胞培養段階で得られた幹細胞を培養する。S3の幹細胞培養工程では、血清を用いて上記幹細胞を培養できればよく、その具体的な手法等については特に限定されるものではない。一般的には、従来公知の手法を利用して、上記幹細胞を培養すればよい。したがって、例えば、市販のマイクロピペットを用いて、上記幹細胞を血清を含む培地に移し替えて培養することができる。
- [0049] 上記血清としては、例えば、ウシ胎児血清およびトリ血清等が挙げられるが、これらは特に限定されるものではない。また、本実施の形態では、これら血清を1種類用いてもよく、必要に応じて2種類以上用いてもよい。
- [0050] また、上記血清の濃度は、5〜30%であることが好ましく、10〜20%であることがより好ましく、このような血清濃度で培養を行えば、良好な結果が得られる。しかしながら、それ以下あるいはそれ以上の濃度であっても、本発明は実施可能であるため、上述の血清濃度に限定されるわけではない。
- [0051] 本実施の形態では、上記血清に加えて、さらに成長因子を用いて上記幹細胞を培養してもよい。上記成長因子としては、具体的には、例えば、EGF (epidermal growth factor: 上皮成長因子)、FGF (fibroblast growth factor: 繊維芽細胞成長因子) 等が挙げられる。本実施の形態では、これら成長因子を1種類用いてもよく、必要に応じて2種類以上用いてもよい。
- [0052] また上記成長因子の濃度は、特に限定されるものではなく、必要に応じて適宜設定すればよいものとする。



- [0053] また、本実施の形態では、特に限定されるものではないが、S3の幹細胞培養工程において、上記幹細胞の培養期間を1〜3ヶ月とすることが好ましい。上記S3の幹細胞培養工程において、培養期間が1ヶ月以下(特に、2週間以下)だと分化誘導効率が下がるため好ましくなく、逆に3ヶ月以上では凝集塊の内部の細胞生存が悪くなる可能性があるため好ましくない。
- [0054] 本実施の形態では、上記S3の幹細胞培養工程を行うことで胚様体を得る。この胚様体は、動物の虹彩色素上皮細胞由来であり、この虹彩色素上皮細胞は外胚葉性の細胞である。したがって、本実施の形態で得られる上記胚様体には神経幹細胞が含まれるが、それ以外に、例えば筋肉細胞や血管内皮様細胞等、様々な組織細胞が上記胚様体には含まれている。このように、本実施の形態によれば、S3の幹細胞培養工程により、動物の虹彩色素上皮細胞由来の組織細胞を得ることができる。
- [0055] 本実施の形態にかかる組織細胞の生産方法は、上記虹彩色素上皮細胞が、動物の眼球から虹彩組織を摘出する虹彩組織摘出工程と、摘出した上記虹彩組織から虹彩組織上皮を分離する虹彩色素上皮分離工程とにより単離される方法である。なお、本発明にかかる組織細胞の生産方法はこれに限定されるものではなく、他の工程が含まれていてもよい。
- [0056] すなわち、本実施の形態の組織細胞の生産方法は、図1に示すように、少なくとも虹彩色素上皮細胞単離工程(S1)幹細胞生産工程(S2)、および幹細胞培養工程(S3)とが含まれ、さらに、上記虹彩色素上皮細胞単離工程(S1)には、後述する虹彩組織摘出工程(P1)および虹彩色素上皮分離工程(P2)が含まれる。なお、本発明にかかる組織細胞の生産方法はこれに限定されるものではなく、他の工程が含まれていてもよい。
- [0057] 上記虹彩組織摘出工程(P1)は、動物の眼球から虹彩組織を摘出できれば良く、その具体的な手法等については特に限定されるものではない。一般的には、従来公知の手法を利用して、動物の眼球から虹彩組織を摘出すればよい。好ましくは、nature neuroscience (2001) 4 (12), 1163(前記非特許文献2)に記載の方法を利用して、動物の眼球から虹彩組織を摘出すればよい。
- [0058] ここで、上記虹彩組織摘出工程(P1)は、図1に示すように、P3として、動物の眼球

から虹彩組織のみを切除する虹彩組織切除段階を、P4として、切除した虹彩組織を酵素処理する酵素処理段階を、P5として、酵素処理した虹彩組織を回復させる虹彩組織回復処理段階を含んでいる。なお、本発明にかかる組織細胞の生産方法はこれに限定されるものではなく、他の工程が含まれていてもよい。

[0059] 以下、虹彩組織摘出工程(P1)の各段階P3〜P5について詳細に説明する。まず、P3の虹彩組織切除段階は、動物の眼球から虹彩組織のみを切除できればよく、その具体的な手法等については特に限定されるものではない。一般的には、従来公知の手法を利用して、動物の眼球から虹彩組織のみを切除すればよい。

[0060] 例えば、P3の虹彩組織切除段階は、市販のマイクロ鋏を用いて動物の眼球から虹彩組織のみを切除する。

[0061] P4の酵素処理段階は、虹彩組織から虹彩色素上皮を分離しやすくするために虹彩組織を酵素処理するものであり、その具体的な手法等については特に限定されるものではない。一般的には、従来公知の手法を利用して、虹彩組織から虹彩色素上皮を分離しやすくするために虹彩組織を酵素処理すればよい。

[0062] 例えば、ニワトリの眼球から虹彩色素上皮を分離する場合は、P4の酵素処理段階で、虹彩組織を市販のディスパーゼを含むディスパーゼ溶液中にて15〜40分間反応させた後、市販のEDTA(ethylenediaminetetraacetic acid:エチレンジアミン四酢酸)を含むEDTA溶液中にて20〜30分間反応させる。なお、P4の酵素処理段階に用いられる酵素および試薬は、特に限定されるものではなく、虹彩組織から虹彩色素上皮を分離しやすくするように虹彩組織を処理することが可能な従来公知の酵素および試薬を用いることができる。

[0063] P5の虹彩組織回復処理段階は、酵素処理によって衰弱した虹彩組織を回復させるものであり、その具体的な手法等については特に限定されるものではない。一般的には、従来公知の手法を利用して、酵素処理によって衰弱した虹彩組織を回復すればよい。

[0064] 例えば、P5の虹彩組織回復段階は、P4の酵素処理段階の反応後、虹彩組織を市販のウシ胎児血清を含む培養液中にて、30〜60分間反応させて虹彩組織を回復させる。なお、P5の虹彩組織回復処理段階に用いられる血清を含む培養液および試

薬は、特に限定されるものではなく、衰弱した虹彩組織が回復することが可能な従来公知の血清を含む培養液を用いることができる。

- [0065] また、虹彩組織摘出工程 (P1) においては、P4の酵素処理段階およびP5の虹彩組織回復処理段階の反応時間が特に重要である。P4の酵素処理段階の上記虹彩組織のディスパーゼ溶液による反応時間、および上記EDTA溶液による反応時間、並びにP5の虹彩組織回復処理段階の上記ウシ胎児血清を含む培養液による反応時間を調節することによって、ニワトリだけではなく、マウス、ラット、ヒトの眼球から虹彩色素上皮を分離することができる。
- [0066] マウスの眼球から虹彩色素上皮を分離する場合は、上記虹彩組織を25〜37℃の上記1000U/mLのディスパーゼ溶液により15〜40分間反応させ、室温下にて上記0.05〜0.1%EDTA溶液により16〜40分間反応させ、ウシ胎児血清を8〜10%含む培養液により30〜120分間反応させることが好ましい。
- [0067] また、生後10日のマウス眼球から虹彩色素上皮を分離する場合は、上記虹彩組織を37℃の上記1000U/mLのディスパーゼ溶液により16分間反応させ、室温下にて上記0.05%EDTA溶液により20分間反応させ、ウシ胎児血清を8%含む培養液により90分間反応させることが特に好ましい。
- [0068] また、生後12日のマウスの眼球から虹彩色素上皮を分離する場合は、上記虹彩組織を37℃の上記1000U/mLのディスパーゼ溶液により20分間反応させ、室温下にて上記0.05%EDTA溶液により25分間反応させ、ウシ胎児血清を8%含む培養液により60分間反応させることが特に好ましい。
- [0069] また、生後2ヶ月のマウスの眼球から虹彩色素上皮を分離する場合は、上記虹彩組織を37℃の上記1000U/mLのディスパーゼ溶液により30分間反応させ、室温下にて上記0.05%EDTA溶液により40分間反応させ、ウシ胎児血清を8%含む培養液により30分間反応させることが特に好ましい。
- [0070] ラットの眼球から虹彩色素上皮を単離する場合は、上記虹彩組織を37℃の上記1000U/mLのディスパーゼ溶液により15〜40分間反応させ、室温下にて上記0.05%EDTA溶液により15〜60分間反応させ、ウシ胎児血清を8〜10%含む培養液により30〜120分間反応させることが好ましい。

- [0071] ヒト胎児の眼球から虹彩色素上皮を分離する場合は、上記虹彩組織を25〜37℃の上記500〜1000U/mLのディスパーゼ溶液により15〜30分間反応させ、室温下にて上記0.05〜0.1%EDTA溶液により15〜40分間反応させ、ウシ胎児血清を8〜10%含む培養液により10〜60分間反応させることが好ましい。
- [0072] また、生後19週のヒト胎児の眼球から虹彩色素上皮を分離する場合は、上記虹彩組織を37℃の上記1000U/mLのディスパーゼ溶液により30分間反応させ、室温下にて上記0.05%EDTA溶液により30分間反応させ、ウシ胎児血清を8%含む培養液により60分間反応させることが特に好ましい。
- [0073] なお、上記培養液としては、例えば、DMEM培地(invitrogen社製)を用いて、市販のウシ胎児血清を適量添加したものをを用いればよい。
- [0074] P2の虹彩色素上皮分離工程は、虹彩組織摘出工程(P1)にて摘出した虹彩基質と虹彩色素上皮とから構築される虹彩組織から、虹彩色素上皮のみを分離できればよく、その具体的な手法等については特に限定されるものではない。一般的には、従来公知の手法を利用して、虹彩組織から虹彩色素上皮のみを分離すればよい。
- [0075] 例えば、P2の虹彩色素上皮分離工程は、回復させた上記虹彩組織から、市販のマイクロピンセットを用いて、虹彩色素上皮のみをはがして回収することにより、虹彩基質と虹彩色素上皮とを分離する。
- [0076] このように、本実施の形態によれば、上記虹彩色素上皮細胞を、P1の虹彩組織摘出工程と、P2の虹彩色素上皮分離工程により単離することで、上記虹彩色素上皮細胞を効率よく分離することができ、これにより上記組織細胞を効率よく生産することができる。
- [0077] 以上のように、本実施の形態にかかる組織細胞は、患者本人からその細胞の一部を採取することが可能な虹彩色素上皮細胞に由来している。したがって、本実施の形態によれば、本人の虹彩色素上皮細胞から、種々の組織細胞への分化能を有する多能性幹細胞を生産することができる。そして、この多能性幹細胞を種々の分化条件下で培養することによって、さらに、再生医療において移植源として活用される各種の組織細胞を生産することができる。また、本実施の形態の組織細胞を移植細胞源として用いれば、細胞移植による免疫拒絶の問題、倫理的問題、移植源細胞の需

要と供給のアンバランスなどの問題を解決することができる。

[0078]   〔実施例〕

以下、実施例および図2～図6(b)に基づいて本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

[0079]   〔実施例1〕

(虹彩色素上皮細胞の単離)

市販のマイクロ鋏を用いて、ニワトリ雛の眼球から虹彩組織のみを切除した。この虹彩組織を37℃のデイスパーゼ溶液(「デイスパーゼ(dispose)」合同清酒社製)1000 U/mL中にて、15～40分間反応させた後、室温下で0.05%EDTA(ethylenediaminetetraacetic acid:エチレンジアミン四酢酸)溶液中にて20～30分間反応させた。

[0080]   反応後、上記虹彩組織をウシ胎児血清を8%含む培養液(「DMEM培地」invitrogen社製)中にて、30～60分間反応させ、上記虹彩組織を回復させた。その後、市販のマイクロピンセットを用いて、虹彩色素上皮のみを上記虹彩組織からはがして回収することにより、虹彩基質と虹彩色素上皮とを分離した。

[0081]   (浮遊凝集塊培養法)

上記分離した虹彩色素上皮は、市販のトリプシン溶液を用いて細胞に解離した。その後、この解離した虹彩色素上皮細胞を、Science 1992: 225; 1707-1710に記載の浮遊凝集塊培養法(neurosphere法)によって、選択的に培養した。

[0082]   浮遊凝集塊培養の培地には、無血清培地(「DMEM/F12培地」invitrogen社製)に、N2サプリメント(invitrogen社製)を100分の1量、FGF2(fibroblast growth factor-2:繊維芽細胞成長因子-2, PeproTech社製)を20ng/mL単独、あるいは、LIF(leukemia inhibitory factor:白血病阻害因子, ESGRO, Chemicon社製)を1000U/mL、およびSCF(human SCF (Stem Cell Factor:ヒト幹細胞因子), DIACLONE社製)を10ng/mLになるように加えた。

[0083]   トリプシン処理した上記虹彩色素上皮細胞を、上記の浮遊凝集塊培地にて、市販のシェーカーを用いて回転を与えながら炭酸ガス培養機中で3～7日間培養をすることで幹細胞を得た。得られた幹細胞の様子を図2の(a)に示す。

[0084] (幹細胞培養による凝集塊の形成)

上記ニワトリ雛の眼球より単離した虹彩色素上皮細胞を上記浮遊凝集塊培養後、幹細胞培養を以下のように行った。

[0085] 上記浮遊凝集塊培養法により得られた上記ニワトリ雛の虹彩色素上皮細胞由来の幹細胞を、市販のマイクロピペットを用いて、以下の(b)および(c)に示す組成の培地に移動した。

(b)ウシ胎児血清(8%)およびニワトリ血清(2%)を含むDMEM培地(invitrogen社製)。

(c)ウシ胎児血清(8%)、および成長因子としてのEGFおよびFGF2(各々20ng/mL)を含むDMEM培地(invitrogen社製)。

[0086] そして、上記(b)および(c)それぞれの培地を用いて上記幹細胞を1〜2ヶ月間培養した。その結果、図2((b), (c))にそれぞれ示すような凝集塊を得た。

[0087] 上記(b)、(c)それぞれの培地にて培養することで得られた凝集塊を、デスミン(筋肉細胞マーカー)抗体、およびDAPI染色(核)にて標識を行った。その結果を図3(a)および図3(b)に示す。図3(a)は、図2における(b)に示す培地で培養することで得られた凝集塊を示し、図3(b)は、図2における(c)に示す培地で培養することで得られた凝集塊を示している。図3(a)および図3(b)において、白色の部分でデスミンで標識された凝集塊の像を示しており、灰色で示す部分がDAPI染色(核)で標識された凝集塊の像を示している。

[0088] [実施例2]

実施例1と同様にして解離した虹彩色素上皮細胞を、無血清培地(「DMEM/F12培地」invitrogen社製)、N2サプリメント(invitrogen社製)100分の1量およびFGF2(fibroblast growth factor-2:繊維芽細胞成長因子-2, PeproTech社製)20ng/mLで3日間培養した後、下記(1)〜(3)の組成を含む3種類の培地中で、浮遊凝集塊培養法による培養を1〜2ヶ月間行った。

(1)ウシ胎児血清(8%)、EGF(20ng/mL)、およびFGF2(20ng/mL)。

(2)ウシ胎児血清(8%)およびニワトリ血清(2%)。

(3)ウシ胎児血清(8%)、ニワトリ血清(2%)、EGF(20ng/mL)、およびFGF2(20ng

/mL)。

- [0089] 得られた凝集塊からRNAを抽出し、RT-PCR法を用いて内胚葉マーカーである $\alpha$ フェトプロテイン、中胚葉マーカーであるミオシンおよびMEF2、外胚葉マーカーであるpax6およびチューブリンJについて、遺伝子発現の有無を調べた。その結果、上記(1)～(3)のどの条件下でも、上記マーカー遺伝子の発現が認められた。このことから、得られた凝集塊には、三胚葉すべての組織系列に分化した細胞が含まれていることがわかる。
- [0090] この結果より、上記凝集塊は、主にES細胞が分化誘導により形成し、胚のように多種多様な分化細胞を含む胚葉体と呼ばれる細胞構造体と同様の性質を有したものであることがわかった。虹彩色素上皮細胞は外胚葉性の細胞だが、本実施例により、動物の虹彩色素上皮細胞由来の幹細胞から、胚葉性を越えた分化を起こすことができることが示された。つまり、幹細胞生産工程によって得られる細胞は、中胚葉、内胚葉、外胚葉の何れにも分化することのできる三胚葉性分化能を有する多能性幹細胞であることが示された。
- [0091] また、図4には、3日間の無血清培地での培養の段階(すなわち、幹細胞生産工程S2)と、その後の1～2ヶ月の培養の段階(幹細胞培養工程S3)、それぞれにおける培養細胞について、RNAを抽出し、RT-PCR法にて心筋細胞特異的遺伝子の発現誘導を確認した結果を示す。
- [0092] レーン1は、S2の幹細胞生産工程における細胞培養段階(S7)の培養2日目のサンプルでの結果である。また、レーン2は、S3の幹細胞培養工程における、上記(3)の条件下で培養2ヶ月後のサンプルでの結果である。この図に示す結果から、レーン1の幹細胞生産工程では、多能性幹細胞が組織細胞へ分化する以前の状態であり、レーン2の幹細胞培養工程中に、心筋細胞へと分化していることがわかる。
- [0093] [実施例3]
- Oct-3/4は、全能性未分化細胞に特異的に発現する分子であり、その発現が確認される細胞は極めて限定される(図5に示す「マウス初期発生過程におけるOct-3/4発現様式」を参考)。生後においては、生殖幹細胞である、精原細胞でのみ発現すると知られており、他の体細胞組織には発現はないとされてきた。

[0094] 本実施例では、出生後のマウスおよびラットの虹彩組織およびそれから得た幹細胞の一部におけるOct-3/4の発現を調べた。その結果を図6(a)、図6(b)に示す。なお、図6(a)および図6(b)は、本発明による方法を用いて出生後11日および3週間目のラットそれぞれから得た幹細胞を、Oct-3/4抗体による染色およびDAPI染色にて標識を行った結果を示しており、白色が標識された部分を示している。図6(a)、図6(b)の結果から、出生後のマウスおよびラットの虹彩組織およびそれから得た幹細胞の一部において、Oct-3/4遺伝子の発現、および、遺伝子産物(Oct-3/4タンパク質)の発現がある(すなわち、Oct-3/4陽性である)ことがわかる。

[0095] この結果は、虹彩という体細胞組織中にも、未分化全能性を維持する細胞が含まれている可能性を強く示唆するものであり、これらの細胞を純化、培養し、適する条件で分化誘導できれば、様々な組織細胞を生産することが可能となる。ES細胞を応用した再生医療の研究は盛んに行われているが、倫理的問題が大きい。虹彩組織であれば、患者本人の細胞を用いることが可能であるので、自家移植による再生医療を実現することにつながると期待される。

[0096] 尚、発明を実施するための最良の形態の項においてなした具体的な実施態様または実施例は、あくまでも、本発明の技術内容を明らかにするものであって、そのような具体例にのみ限定して狭義に解釈されるべきものではなく、本発明の精神と次に記載する特許請求の範囲内で、いろいろと変更して実施することができるものである。

#### 産業上の利用の可能性

[0097] 以上のように、本発明の組織細胞の生産方法によれば、動物の虹彩色素上皮細胞から、種々の組織細胞への分化能を有する多能性幹細胞を生産し、さらに、この多能性幹細胞から種々の組織細胞を生産することができるという効果を奏する。この組織細胞は、再生医療で移植源として活用すること可能である。

[0098] また、本発明の生産方法によって得られた組織細胞は、細胞移植による免疫拒絶の問題、倫理的問題、移植源細胞の需要と供給のアンバランスの問題などを解決し得る移植源として提供することができる。



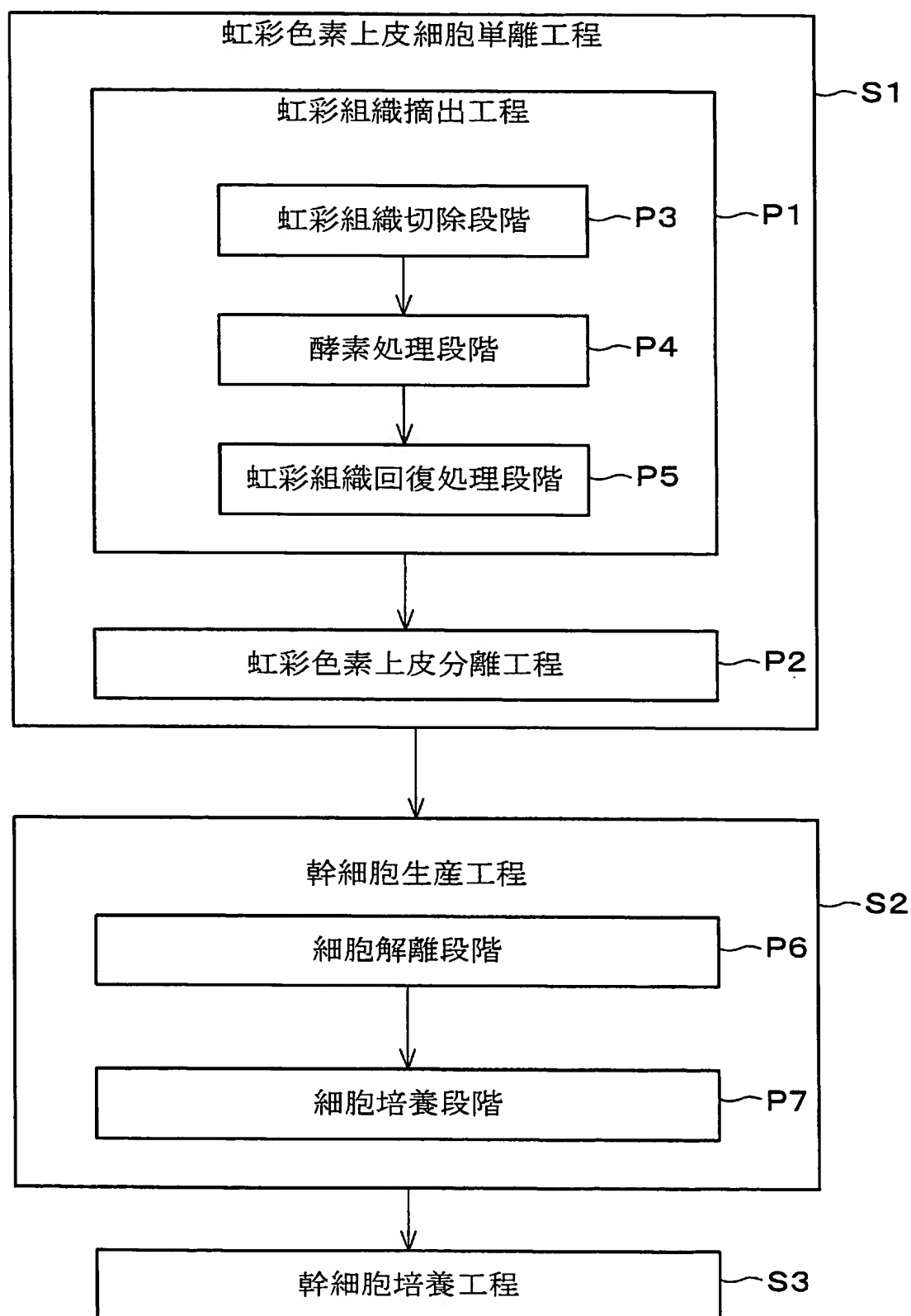
## 請求の範囲

- [1] 動物の眼球から単離した虹彩色素上皮細胞を浮遊凝集塊培養方法により選択的に培養することで多能性幹細胞を得る工程と、上記多能性幹細胞を培養して、当該多能性幹細胞から組織細胞を得る工程とを含むことを特徴とする組織細胞の生産方法。
- [2] 上記動物は、ニワトリ、マウス、ラット、ヒトのいずれかであることを特徴とする請求項1に記載の組織細胞の生産方法。
- [3] 上記動物は、出生後の個体であることを特徴とする請求項1または2に記載の組織細胞の生産方法。
- [4] 上記多能性幹細胞は、Oct-3/4陽性であること、および／または、三胚葉性分化能を有すること、を特徴とする請求項1〜3の何れか1項に記載の組織細胞の生産方法。
- [5] 上記虹彩色素上皮細胞は、動物の眼球から虹彩組織を摘出する虹彩組織摘出工程と、  
摘出した上記虹彩組織から虹彩色素上皮を分離する虹彩色素上皮分離工程とにより単離されることを特徴とする請求項1〜4の何れか1項に記載の組織細胞の生産方法。
- [6] 上記虹彩組織摘出工程は、動物の眼球から虹彩組織のみを切除する虹彩組織切除段階と、  
上記切除した虹彩組織を酵素処理する酵素処理段階と、  
上記酵素処理した虹彩組織を回復させる虹彩組織回復段階とを含んでいることを特徴とする請求項5に記載の組織細胞の生産方法。
- [7] 上記の多能性幹細胞から組織細胞を得る工程では、上記多能性幹細胞を、分化条件下の培養において、1種類以上の組織細胞に分化させることを特徴とする請求項1〜6の何れか1項に記載の組織細胞の生産方法。
- [8] 上記分化条件下の培養では、血清を用いて培養を行うことを特徴とする請求項7に記載の組織細胞の生産方法。
- [9] 上記血清は、ウシ胎児血清またはトリ血清であることを特徴とする請求項8に記載の

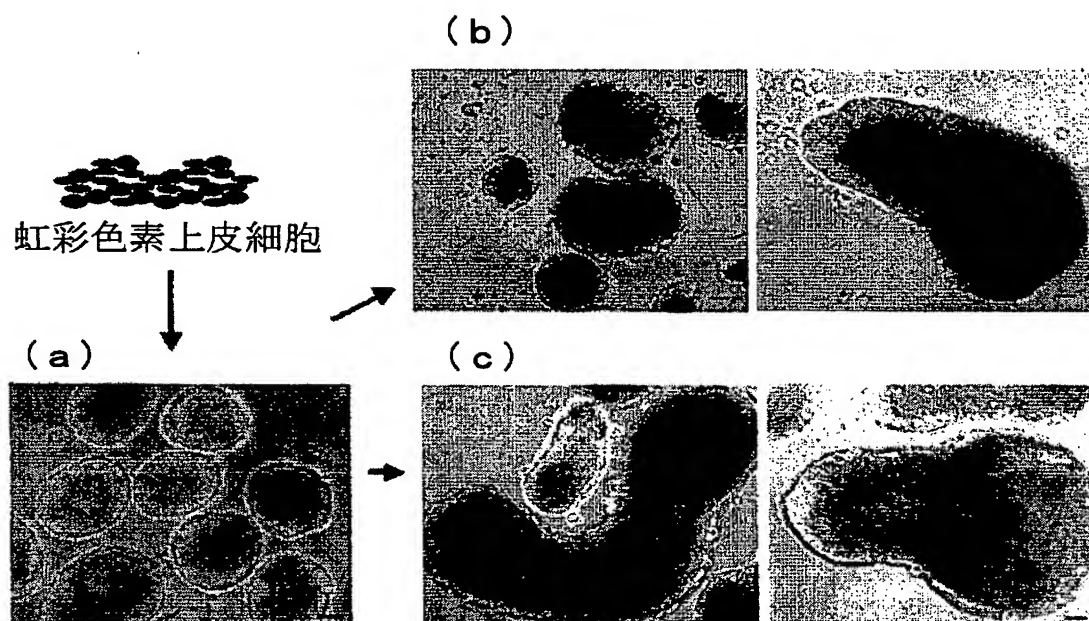
組織細胞の生産方法。

- [10] 上記分化条件下の培養において、さらに成長因子を用いることを特徴とする請求項8または9に記載の組織細胞の生産方法。
- [11] 上記成長因子は、EGFまたはFGFであることを特徴とする請求項10に記載の組織細胞の生産方法。
- [12] 請求項1～11の何れか1項に記載の組織細胞の生産方法により得られる組織細胞。  
。
- [13] 上記組織細胞は、外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞、中胚葉細胞または中胚葉由来の細胞、内胚葉細胞または内胚葉由来の細胞のうちの何れかであることを特徴とする請求項12に記載の組織細胞。
- [14] 上記組織細胞は、生体内の器官を構成する組織を形成することを特徴とする請求項12または13に記載の組織細胞。

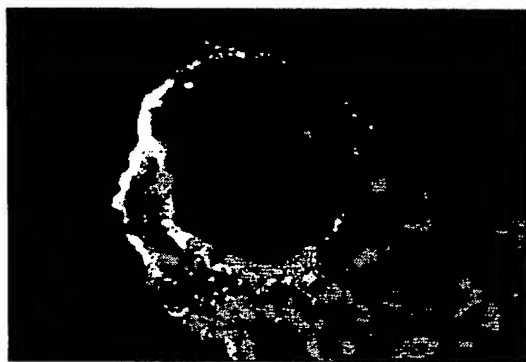
[図1]



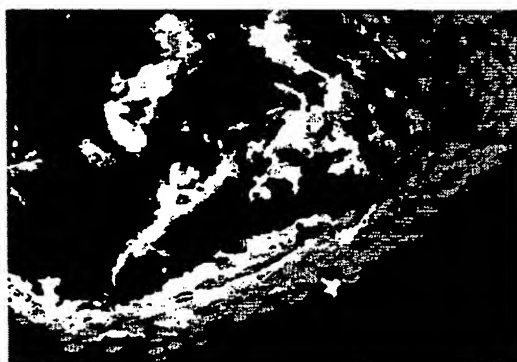
[図2]



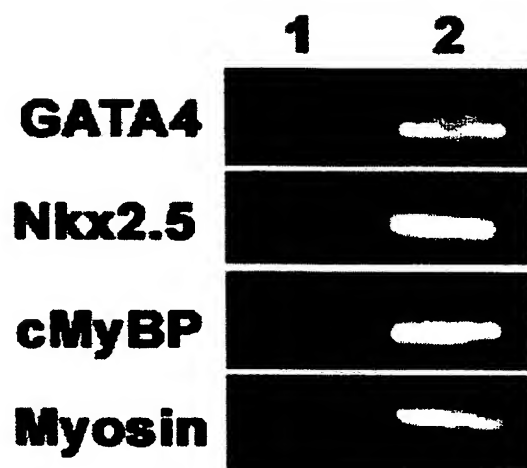
[図3(a)]



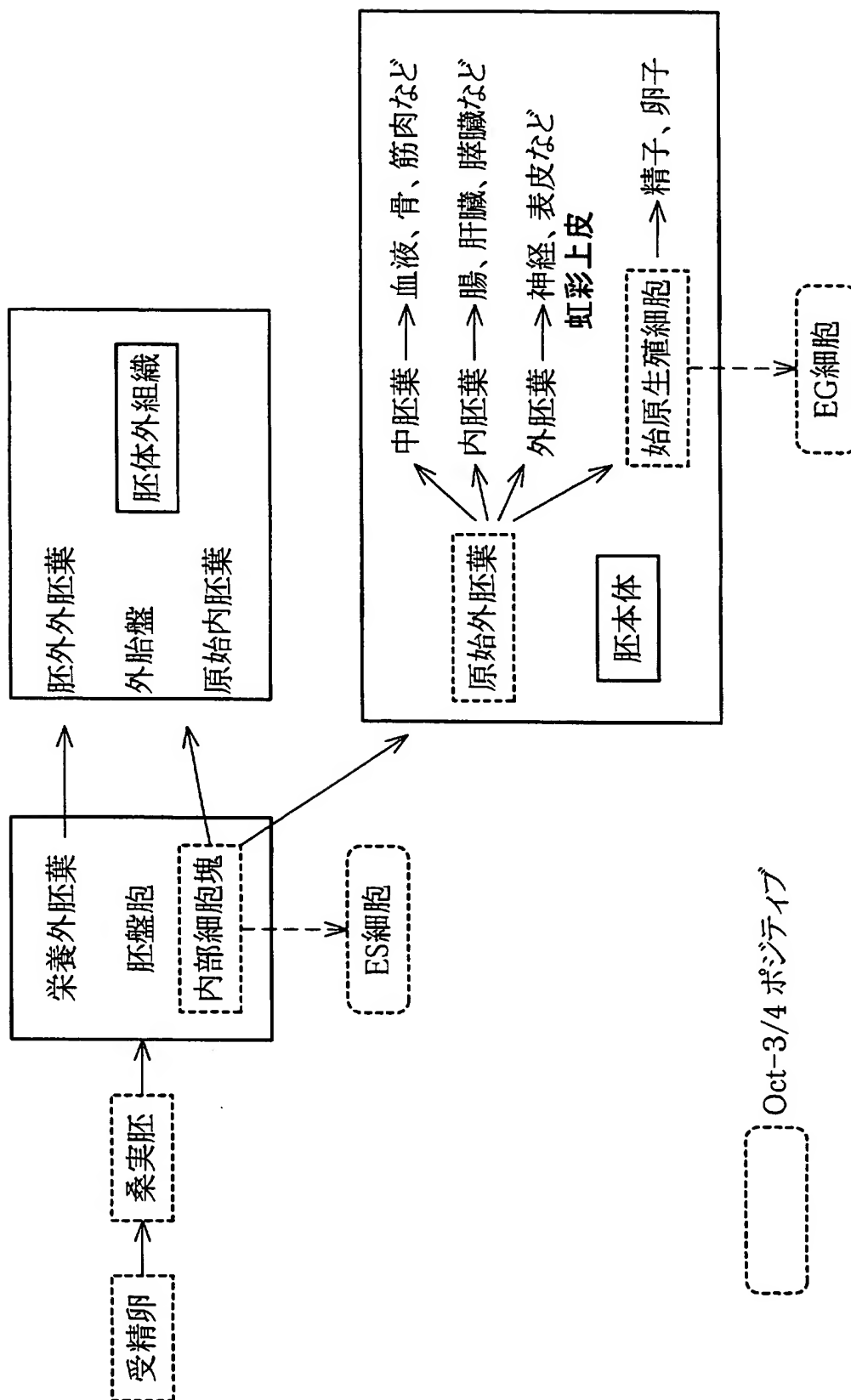
[図3(b)]



[図4]

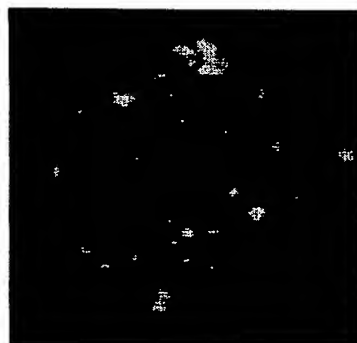
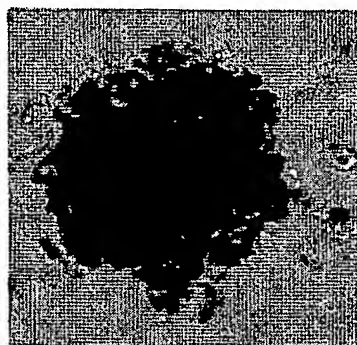


[図5]



[図6(a)]

11日 ラット

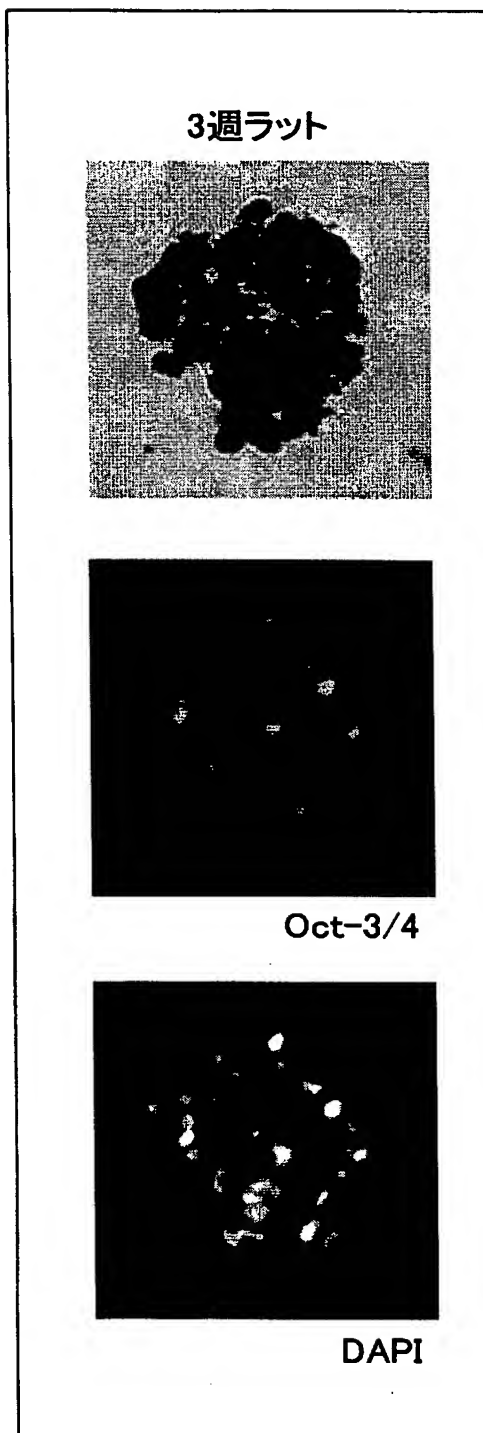


Oct-3/4



DAPI

[図6(b)]





# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/008120

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N5/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N5/06

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JICSTPLUS, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), PUBMED

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HAYASHI T. et al., Regulated lens regeneration from isolated pigmented epithelial cells of newt iris in culture in response to FGF2/4, Differentiation (2002), Vol.70, Nos. 2 to 3; pages 101 to 108	1-14
A	KOSAKA M. et al., In Vitro Culture System for Iris-Pigmented Epithelial Cells for Molecular Analysis of transdifferentiation, Exp.Cell.Res., (1998), Vol.245, pages 245 to 251	1-14
A	TOMITA H. et al., "Momaku Soshiki Saisei Chiryo eno Approach", Drug Delivery System 20 March, 2003 (20.03.03), Vol.18, No.2, pages 95 to 103	1-14

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

02 July, 2004 (02.07.04)

Date of mailing of the international search report

20 July, 2004 (20.07.04)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))  
Int.Cl<sup>7</sup> G12N5/06

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))  
Int.Cl<sup>7</sup> C12N5/06

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)  
JICSTPLUS, WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG), PUBMED

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	HAYASHI T. <i>et al.</i> , Regulated lens regeneration from isolated pigmented epithelial cells of newt iris in culture in response to FGF2/4, Differentiation (2002), Vol.70, No.2-3, p.101-108	1-14
A	KOSAKA M. <i>et al.</i> , In Vitro Culture System for Iris-Pigmented Epithelial Cells for Molecular Analysis of transdifferentiation, Exp.Cell. Res., (1998), Vol.245, p.245-251	1-14

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

\* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

02.07.2004

国際調査報告の発送日

20.7.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

上 條 肇

4 B

9453

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	TOMITA H. <i>et al.</i> , 網膜組織再生治療へのアプローチ, Drug Delivery System (2003-Mar-20), Vol.18, No.2, p. 95-103	1 - 14